

主論文の要旨

**Role of Girdin in intimal hyperplasia in vein
grafts and efficacy of atelocollagen-mediated
application of siRNA for vein graft failure**

〔 静脈グラフトの内膜肥厚における Girdin の役割と静脈グラフト
閉塞に対するアテロコラーゲンを用いた siRNA 治療の有効性 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻
病態外科学講座 血管外科学分野

(指導 : 古森 公浩 教授)

宮地 紘樹

【緒言】

虚血性心血管疾患における自家静脈グラフトを用いたバイパス術後に、約 20-30% が晩期閉塞に陥ることから、その原因である血管内膜肥厚の発症機構を明らかにし、その治療法を確立することは急務である。血管平滑筋細胞の移動と増殖が内膜肥厚の主な原因であることは周知の事実であるが、静脈グラフトの内膜肥厚を抑制する方法は確立されていない。Girdin はアクチン結合タンパク質として知られ、血管内皮細胞や平滑筋細胞、神経芽細胞、癌細胞といった様々な細胞の移動および増殖を制御する。我々は、最近の研究において血管平滑筋細胞と内皮細胞に発現している Girdin が生後の血管新生に重要な役割をしていることを報告した。また Girdin と Akt によるリン酸化とが動脈血管平滑筋細胞の細胞移動や増殖に深く関与しており、動脈血管リモデリングにおける重要な調節因子であることも明らかにしてきた。一方で、異常血流条件下での自家静脈グラフト内膜肥厚と Girdin との関連についてはこれまで検討されることがない。今回、静脈由来の血管平滑筋細胞と静脈グラフトに生じる新生内膜形成における Girdin の役割を解析し、さらには Girdin をターゲットとした新たな心血管病治療の可能性を検討した。

【方法】

ウサギ頸動脈に対し頸静脈を用いた静脈グラフト置換術を行った。その際に、より内膜肥厚を顕著にするために吻合する動脈の末梢 4 本の動脈のうち 3 本を結紮した異常血流モデルを作成した (Fig. 1A, 2A)。後日採取した静脈グラフトの新生内膜から得られた血管平滑筋細胞の初代培養を行い (Fig. 3A)、細胞生物学的な解析を行った。また、アテロコラーゲンを用いて Girdin に対する siRNA (以下、Girdin siRNA と表記) を静脈グラフトに局所投与し、内膜肥厚に対する抑制効果を検証した。

【結果】

ウサギ静脈グラフトにおける Girdin の発現は、抗 Girdin 抗体を用いた免疫染色および Western blot 法の両方で術後 14 日目をピークとする増加を示した (Fig. 1B, C)。また抗 Girdin 抗体と抗 α -SMA 抗体を用いた二重蛍光免疫染色で血管平滑筋細胞に Girdin が発現していることが確認された (Fig. 1D)。さらに Girdin の発現は顕著な内膜肥厚形成を来す異常血流モデルの静脈グラフトで有意に増加していた (Fig. 2B)。静脈グラフトの新生内膜から培養した血管平滑筋の初代培養細胞において、Girdin をノックダウンすることでアクチンストレスファイバーの形成やラメリポディアの形成が障害され (Fig. 3B-D)、Wound healing assay の結果、Girdin のノックダウンにより細胞運動能は有意に低下した (Fig. 4A-C)。また、血管平滑筋の初代培養細胞を用いた WST-1 assay では細胞増殖能が Girdin のノックダウンにより有意に低下していた (Fig. 4D)。さらに、ウサギ静脈モデルを用いた *in vivo* の実験を行った。静脈グラフト置換術時に、Girdin siRNA とアテロコラーゲンとを混合したものを静脈グラフト周囲に局所投与することで、少なくとも術後 2 週間 Girdin の発現を抑制するこ

とができた (Fig. 5A)。また、術後 4 週のウサギ静脈グラフトにおける新生内膜形成は Girdin siRNA 投与群で、コントロール群に比べ有意に抑制されていた (Fig. 5B-D)。静脈グラフトの抗 Ki-67 抗体を用いた免疫染色では Girdin ノックダウン群で Ki-67 陽性細胞が有意に減少したが、TUNEL 染色ではアポトーシス細胞数割合に変化を認めなかった (Fig. 6A-E)。

【考察】

Girdin がウサギ静脈グラフトの中膜および新生内膜の血管平滑筋細胞に発現していることが確認され、顕著な内膜肥厚形成を来す異常血流モデルでより強く発現していることが明らかとなった。このことから静脈グラフトの内膜肥厚に Girdin が強く関与していることが示唆された。

静脈血管平滑筋細胞における Girdin の機能を調べるために、静脈グラフトの新生内膜から血管平滑筋細胞の初代培養を行った。Girdin は静脈血管平滑筋細胞のアクチン細胞骨格再構築に重要であり、ラメリポディアやストレスファイバーなどの構造の形成に必須であることが明らかとなった。また、Girdin のノックダウンにより細胞運動能や増殖能は有意に低下した。このことより Girdin が静脈血管平滑筋細胞の細胞運動や細胞増殖に関与していることが明らかになった。

さらに、*in vivo* での Girdin の役割を検討するために、Girdin siRNA とアテロコラーゲンを混合したものを静脈グラフト周囲に投与したところ、術後 4 週間後の静脈グラフトの内膜肥厚が有意に抑制された。その機序としては細胞増殖抑制が示唆されたが、アポトーシスに関しては変化を認めなかった。アテロコラーゲンと siRNA を用いた Girdin ノックダウンは、生体への毒性も少なく局所的な効果も持続することから静脈グラフト晩期閉塞に対する新しい治療法として期待できる。

【結語】

Girdin は静脈血管平滑筋細胞の細胞移動や増殖に深く関与していることが明らかとなった。また静脈グラフトモデルにおいて Girdin をノックダウンすることで新生内膜形成が有意に抑制された。以上より、アテロコラーゲンをを用いた Girdin ノックダウンが、内膜肥厚による静脈グラフト晩期閉塞に対する新規治療法として臨床応用されることが期待される。